

ネズミ糞線虫の発育・分化に関する研究

I. 第1期幼虫の分離法について

田口五弘 須藤千春 熊田信夫

(昭和63年11月22日掲載決定)

要 約

ネズミ糞線虫 *Strongyloides ratti* の発育・分化に関する研究に資する目的で第1期幼虫を感染ラットの糞便から分離する方法について検討した。イソペーク溶液および蔗糖液を用いた不連続密度勾配遠心法により分離を試みたところ、大部分の幼虫は密度約1.05 g/mlおよび1.07 g/mlの画分からそれぞれ回収された。さらに、操作の簡便化をはかるために、蔗糖液を用いた遠心浮上法についても検討した。その結果、糞線虫感染ラットの糞溶解液の遠心沈渣を40%蔗糖液で再浮遊し、これに少量(1 ml)の蒸留水を重層して1,500rpm, 3分間遠心すると、蔗糖液と蒸留水の境界層から93%以上の幼虫が回収された。この方法、すなわち蒸留水重層蔗糖液遠心浮上法は分離操作の簡便性・確実性・高回収率および経済性などからみて、従来から慣用されている分離方法より優れているものと考えられた。

Key words: *Strongyloides ratti*, first-stage larva, sucrose, discontinuous density gradient, centrifugation flotation

はじめに

ヒトの糞線虫 *Strongyloides stercoralis* は熱帯・亜熱帯に広く分布し、我が国でも九州南部、特に奄美・沖縄地域が浸淫地として知られている。この糞線虫の小腸粘膜内寄生による症状は、患者の約半数が無症状または下痢を主徴とする軽度の消化器障害を呈する程度であるが、宿主の免疫機能が低下した場合などには播種性の過剰感染によって、ときには致死的なこともある(田中, 1955; Galliard, 1967; 加藤ら, 1970; 堀・高木, 1972; 塩坂ら, 1979; 川平, 1983; Neva, 1986)。また最近では糞線虫感染と成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)の感染との関連性が指摘されている(Nakada *et al.*, 1984; Fujita, *et al.*, 1985; Yamaguchi *et al.*, 1987)。

ヒトの糞線虫は猿・犬・猫には感染するが、小型実験動物の体内では発育が完了しないために、ヒトの糞線虫と同属・近縁で共通点の多いネズミ糞線虫 *Strongyloides ratti* が実験モデルとして広く用いられている(天野, 1959; Tanaka and Amano, 1960; Tada *et al.*, 1979; Murrell, 1981; Owhashi *et al.*, 1986)。

Strongyloides 属の線虫は、その生活史に自由世代と寄生世代とを持ち、寄生世代の雌は単為生殖により産卵する。孵化した幼虫は自由世代のラブリチス型の雌または雄成虫に発育するものと、第3期幼虫(フィラリア型幼虫)に発育して宿主に感染するものとに別れる。この

(名古屋大学医学部区動物学教室)

ような二方向の発育・分化を支配する要因については古くから研究されてきたが、未解決な点が多い(田中, 1955; 阿部・田中, 1965; Galliard, 1967; Triantaphyllou and Moncol, 1977)。

発育・分化に関する要因を検討する手段として、感染宿主動物の糞に含まれる幼虫包蔵卵(虫卵)および第1期幼虫(L₁幼虫)を濾紙培養法等によって発育させ、温度、栄養および個体数密度などの環境条件の発育・分化に及ぼす影響について以前から検討されている(田辺, 1938; Graham, 1939; Premvati, 1958 a, 1958 b; Hansen *et al.*, 1969; Arizono, 1976; Moncol and Triantaphyllou, 1978; Nwaorgu, 1983; Shiwaku *et al.*, 1988)。

我々はネズミ糞線虫の発育・分化に関する研究の手始めとして、感染ラット糞よりL₁幼虫を効率的に分離する方法について検討し、改良を加えたので、その結果について報告する。

材料および方法

1) ネズミ糞線虫と実験動物

実験に用いたネズミ糞線虫 *Strongyloides ratti* は、1984年4月に名古屋市港区内の下水溝で捕獲されたドブネズミ *Rattus norvegicus* より分離し、5~8週齢のSprague Dawley系ラットで継代中のものである。原則として2週間間隔で、糞の濾紙培養法で得られた第3期

幼虫 (L₃幼虫) 1,000匹を後腹側部に皮下接種して継代している。

2) 材料の採集およびラット糞再浮遊液の調製

実験に用いた感染ラットは、接種後8日目頃から12日目頃にわたって多くのL₁幼虫と虫卵を糞内に排出したので、この期間の排出後3~4時間以内の糞を供試材料とした。糞の採取時には、金属製網ケージの糞尿受皿に少量の水を入れ、適度の湿度を与えて乾燥を防止した。

採取した糞に約10倍量の蒸留水を加えてよく混和し、一重のガーゼで濾過して粗大夾雑物を除去した。得られた濾液を1,500rpm, 3分間遠心し、沈渣量の約4倍量の蒸留水または10~40%の蔗糖液を加え、再浮遊させた(以下、糞再浮遊液と呼ぶ)。

3) イソペーク溶液および蔗糖液の調製

糞再浮遊液からL₁幼虫と虫卵を分離するために、以下に述べる2種類の不連続密度勾配液を利用した。

まず、血液とほぼ等張で尿路・血管造影剤として広く使用され、またマラリア原虫の分離などにも利用されている (Rowley et al., 1967; Rickwood and Birnie, 1975; Eugui and Allison, 1979; 藤岡ら, 1983) イソペーク®280 [メトリゾ酸のカルシウム・メグルミン塩を60.2 w/v%含有 (鳥居薬品・東京)] を原液として、これを50, 33, 25, 20 w/v%になるように蒸留水で希釈して用いた (以下、イソペーク溶液と呼ぶ)。

また、蒸留水で40, 30, 20, 10 w/v%の蔗糖液を調製して、不連続密度勾配遠心法および遠心浮上法の試薬とした。これら溶液の比重は Table 1 に示した。

4) 糞排出後の経時的孵化率

感染ラットにエーテル麻酔を行い、排出した糞から後述の遠心浮上法によって虫卵を分離し、その孵化率を経時的に測定した。18℃および25℃の室温下で、スライドガラス上にガラス片を接着させ製作した小室 (15mm x 15mm x 3mm) 内に、虫卵浮遊液0.5ml (約150個の虫卵を含む) をとり、カバーガラスを掛けて乾燥を防ぎ30分間隔で4時間にわたって実体顕微鏡下で観察を続け、L₁幼虫に孵化する個体を数えた。

5) L₁幼虫の生存率

20℃の室温下で、前記のスライドガラス上の小室の各々に調製したイソペーク溶液、蔗糖液および対照として蒸留水を0.5ml宛を入れた。L₁幼虫浮遊液25μl (約150匹を含む) を各々の小室に加えて静かに混和し、L₁幼虫の運動性の変化および生死を10分間隔で30分間にわたり実体顕微鏡下で観察した。虫体が収縮し、運動能力を失い、かつ直線状になった個体を蒸留水に浮遊しても、運動能力等に回復が見られなかったので死と判定し、生存率を算出した。

6) 不連続密度勾配遠心法によるL₁幼虫および虫卵の分離

ニトロセルロース製遠心管 (5 ml) 内に、高密度 (50%) のイソペーク溶液から低密度 (20%) の液まで順次に1 ml宛静かに重層し、不連続密度勾配を作成した。この勾配の最上層に糞再浮遊液1 mlのをせ、1,500rpm, 3分間遠心したのち、沈渣の上面にあたる遠心管壁に27 Gの注射針で穴をあけ、流出するイソペーク溶液を5滴宛に分画した。分画後直ちに各画分の密度を測定すると共に、各画分内に含まれるL₁幼虫 (虫卵を含む) を数えた。また同様に40~10%の蔗糖液を用いて不連続密度勾配を作成し、上記と同様の分画処理を行った。この場合には、L₁幼虫および虫卵を別々に計数した。

7) 蔗糖液遠心浮上法によるL₁幼虫の分離

各種濃度に調製した蔗糖液で糞再浮遊液を作り、その4 mlをそれぞれ遠心管に入れ、さらに蒸留水1 mlを重層して、1,500rpm, 3分間遠心し、3滴宛に分画後、L₁幼虫 (虫卵を含む、以下同様) を数えた。

8) 蔗糖液遠心浮上法によるL₁幼虫分離に影響する要因の検討

40%蔗糖液で糞再浮遊液を調製し、a) 蔗糖液量、b) 蒸留水重層の有無、およびc) 遠心条件のL₁幼虫回収率に及ぼす影響を検討した。なお、本調査では糞再浮遊液から0.05mlの5標本をとり、顕微鏡下 (x40) でL₁幼虫を計数し、その平均値から供試液中の総L₁幼虫数を求めた。その総数を基準として、分離操作後の総数から回収率を算出した。

a) 糞沈渣に1~8倍量の40%蔗糖液を加えて糞再浮遊液を調製し、その各々4 mlを遠心管にとり、蒸留水1 mlを重層して、1,500rpm, 3分間遠心し、蒸留水画分のL₁幼虫を数えた。

b) 糞再浮遊液5 mlを遠心管にとり、蒸留水を重層せずに遠心した場合と、糞再浮遊液4 mlに蒸留水1 mlを重層し、遠心を行なった場合のL₁幼虫回収率を比較検討した。

c) 糞再浮遊液4 mlに蒸留水1 mlを重層し、そのまま10分間静置したのち蒸留水画分から幼虫を回収した場合と、1,500rpm, 3分間の遠心操作を行なった際の回収

Table 1. Densities of Isopaque® and sucrose solution used in this study

Isopaque®		Sucrose	
Concentration (%)	Density (g/ml)	Concentration (%)	Density (g/ml)
50	1.14	40	1.18
33	1.08	30	1.13
25	1.05	20	1.08
20	1.03	10	1.04

率を比較した。また蒸留水を重層したのち1,000, 1,500, 2,000および2,500rpmで、3分間または5分間遠心した場合の各々におけるL₁幼虫回収率を比較検討した。

結果

1. 排糞後の経時的幼虫孵化率

排出直後の糞中ではすでに約15.8%の虫卵が孵化して

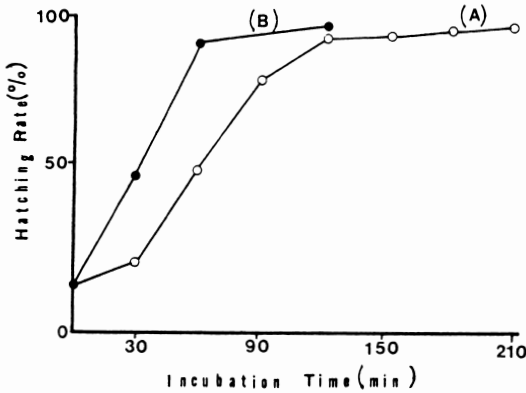


Fig. 1. Effect of temperatures on hatching of *S. ratti* larvae. Eggs suspended in water were incubated at 18°C (A) or 25°C (B).

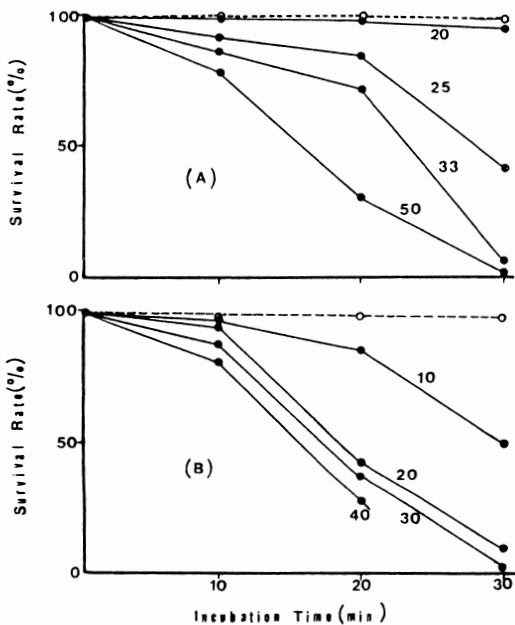


Fig. 2. Survival rates of *S. ratti* first-stage larvae in Isopaque® (A) and sucrose solution (B). Numerals in figures indicate concentration (%) of the solution. Dotted lines show the survival rate of the larvae in distilled water.

L₁幼虫となり、残余は未孵化卵であった。温度条件18°Cでは30分後に21.8%, 60分後に75.1%, 120分後に95.0%, 210分後に99.0%が各々L₁幼虫に孵化した。温度条件25°Cでは孵化が早まり、30分後に47.4%, 60分後に92.3%, 120分後に99.0%がそれぞれL₁幼虫に孵化した (Fig. 1)。これらの結果から、ネズミ糞線虫の虫卵は排出後1~2時間で孵化してL₁幼虫になることが確かめられた。

2. L₁幼虫の生存率

イソペーク溶液内における10分後のL₁幼虫生存率は、50%液で78.5%, 33%液で85.9%, 25%液で90.0%, 20%液で100%であり、20分後にはそれぞれの液内で33.4%, 69.2%, 83.3%, 97.4%, また30分後にはそれぞれ0%, 7.7%, 41.8%, 96.2%であった。

蔗糖液内での生存率は、10分後に40%液で84.2%,

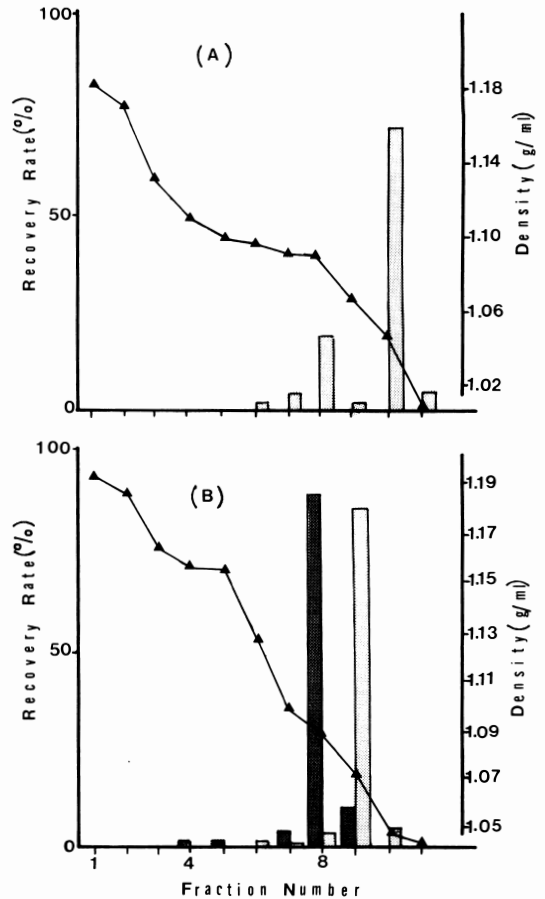


Fig. 3. Isolation of the first-stage larvae and eggs of *S. ratti* by Isopaque® (A) and sucrose (B) discontinuous density gradient centrifugation (stippled, first-stage larvae; cross-hatched, eggs; ▲—▲, density).

30%液で91.4%，20%液で93.2%，10%液で98.2%であり，20分後にはそれぞれ32.1%，38.5%，44.9%，87.7%，30分後にはそれぞれ0%，3.4%，9.0%，51.3%であった。蒸留水内での生存率は30分後でも99.5%であった (Fig. 2)。

3. 不連続密度勾配遠心法による分離

イソベーク溶液では第10画分 (密度1.05 g/ml) に69.7%，第8画分 (密度1.09 g/ml) に18.8%の割合でL₁幼虫 (虫卵を含む) が回収され，両画分中の合計は88.5%であった。一方，蔗糖液の第9画分 (密度1.07 g/ml) から84.3%，第10画分 (密度1.05 g/ml) から11.5%のL₁幼虫 (虫卵を含む) が回収され，これらの2画分を合わせると95.8%の回収率となった。また虫卵は第8画分 (密度1.08 g/ml) から84.6%，第9画分から7.5%が回収され，両画分の合計回収率は92.1%であった (Fig. 3)。

4. 遠心浮上法によるL₁幼虫の分離

10%および20%蔗糖液を用いた場合には，特定の画分に幼虫が集中する傾向はみられなかった。30%蔗糖液を用いた場合には，蔗糖液と蒸留水の境界画分にあたる第8画分から33.9%のL₁幼虫が回収され，残りの幼虫は蔗糖液層の数画分に分布していた。40%蔗糖液を用いた場合には，分離幼虫の集中度が高く73.6%が第8画分から回収された (Fig. 4)。

5. 遠心浮上法によるL₁幼虫回収率に影響を与える要因

a) 蔗糖液量の影響

L₁幼虫の回収率に及ぼす蔗糖液量の影響を調査した結果いずれの液量を用いても回収率は90.5~95.3%の範囲内にあり，実用上問題がないことが分かった (Table 2)。

b) 蒸留水重層の有無の影響

Fig. 5に示すように蒸留水を重層せずに遠心した場合(B)には，最上層の画分 (分画番号12) から22.5%のL₁幼虫が回収され，残りの77.5%のL₁幼虫は画分1~11に分布していた。これに対し，蒸留水を重層して遠心したところ(A)，第8画分から90.3%の幼虫が回収された。この画分内の混入夾雑物は蒸留水を重層しなかった場合の第12画分の夾雑物に比し明らかに少なかった。すなわち，糞再浮遊液に用いた40%蔗糖液に蒸留水を重層して遠心浮上法を行うと，分離効果が向上し，その後の操作が容易になることが判明した。

c) 遠心操作の影響

糞再浮遊液に蒸留水を重層してそのまま静置し，10分後に蔗糖液と蒸留水の境界層からL₁幼虫を回収したところ，僅かに12.9%の低回収率であった。一方同様に処理したのち1,500rpm，3分間遠心したところ，90.8%の高回収率が得られた (Table 3)。

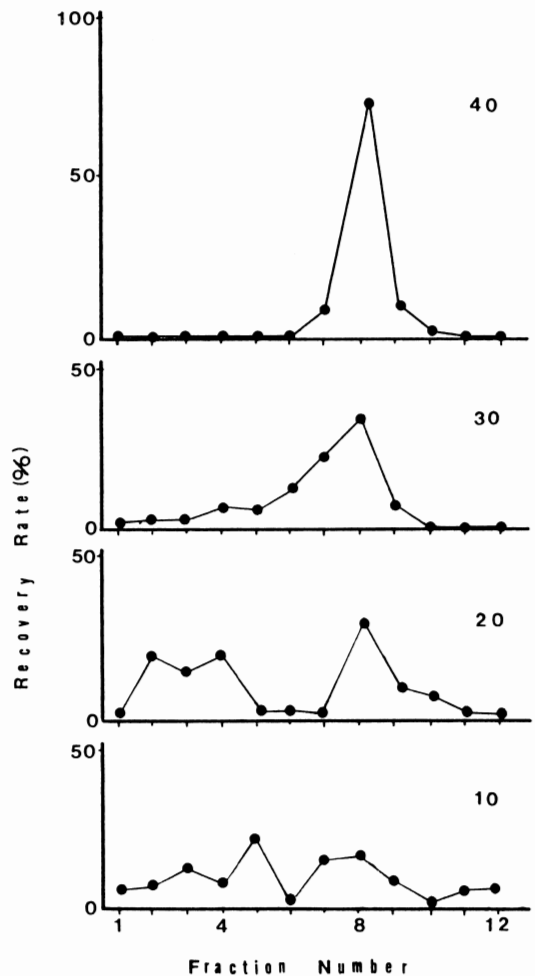


Fig. 4. Effect of sucrose concentration on recovery rates of *S. ratti* first-stage larvae by flotation centrifugation. Numerals in figure show sucrose concentration (%).

次に遠心回転数と遠心時間の差が回収率に及ぼす影響について検討した。前述の材料を1,000rpm，3分間および5分間の遠心では，それぞれ90.5%および93.8%，1,500rpmでは90.8%，94.3%，2,000rpmでは93.9%，95.1%，2,500rpmでは95.4%，96.2%の回収率であった (Table 3)。

考 察

糞線虫類の分化・発育に関する研究に供するために，感染動物の糞から幼虫を分離する方法についてはすでに多数の報告がある。それらは，ベールマン氏法，飽和食塩水浮遊法および遠心分離法に大別される。

Table 2. Effect of ratio of fecal sediments to various amounts of flotation medium on the recovery rate of *S. ratti* larvae

Ratio*		Percent of recovery
Sediment	Medium	
1	: 1	90.5
1	: 2	94.3
1	: 3	95.1
1	: 4	95.3
1	: 6	94.7
1	: 8	93.9

* The fecal sediments (about 2 ml) were resuspended with different volume of 40% sucrose solution.

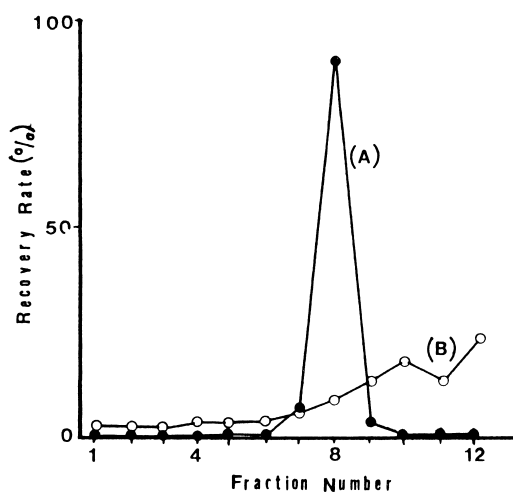


Fig. 5. Recovery rates of the first-stage larvae of *S. ratti* with (A) or without (B) water layer on the top of flotation medium.

1) ベールマン氏法はL₁幼虫の運動性を利用した方法であり, Varju (1966), Nwaorgu (1983), Shiwaku *et al.* (1988) などはこの方法で糞からL₁幼虫を分離し, 培養実験に用いている。我々もネズミ糞線虫感染ラットの糞から, ベールマン氏法 (27℃, 3時間) によってL₁幼虫の分離を試みたが, 回収率は僅かに13.7%にすぎず, 多数のL₁幼虫を得る目的には不適当と判断した (田口ら, 1988)。

2) 密度差を利用した飽和食塩水浮遊法によって, Arizono (1976) は *Strongyloides planiceps* 感染犬の糞から虫卵を分離し蒸留水で洗浄後, 幼虫の分化・発育機構の研究に供し, 卵の飽和食塩水処理は幼虫の孵化率に影響しないと報告している。宮本 (1986) も同様な方法で

Table 3. Effect of number of revolutions and time of centrifugation on the recovery rates of *S. ratti* first-stage larvae

Revolutions per minute	Time (min)	Recovery (%)
0*	0	12.9
1,000	3	90.5
	5	93.8
1,500	3	90.8
	5	94.3
2,000	3	93.9
	5	95.1
2,500	3	95.4
	5	96.2

* The test tube was kept to stand for 10 min.

S. planiceps の幼虫を分離している。しかしネズミ糞線虫のL₁幼虫は短時間で孵化し, また20%以上の蔗糖液による20分間処理でもL₁幼虫の50%以上が死亡したために, この方法も不適切と考えられた。

3) 遠心分離法はさらに a) 遠心沈殿法, b) 密度勾配遠心法および c) 遠心浮上法に分けられる。

a) 遠心沈殿法: 蒸留水で再浮遊させた糞溶液を1,500rpm, 3分間遠心した場合にL₁幼虫は全て沈殿したので, 本法を単純に適用してもL₁幼虫の分離は不可能であると考えられた。そこで本報では不連続密度勾配遠心法と遠心浮上法の二つについて検討を加えた。

b) 不連続密度勾配遠心法: イソパーク液は血球成分に悪影響を与えない血管造影剤として実用化されている。またマラリア原虫の分離にも使用されている (Rowley, *et al.*, 1969; Eugui and Allison, 1979; 藤岡ら, 1983)。そこでネズミ糞線虫L₁幼虫に対しても影響が少ないものと予想して, 各種濃度溶液中におけるL₁幼虫の生存率について検討したところ, Fig. 2 に示したように50%以上のイソパーク溶液および25%以上の蔗糖液では, 20分後の生存率が50%以下に低下した。そこでこれらの溶液中にL₁幼虫が滞留する時間を短縮するために, 遠心操作を1,500rpm, 3分間とした。

その結果, イソパーク溶液では密度1.05 g/ml, 蔗糖液では密度1.07 g/mlの画分にそれぞれ69.7%, 84.3%のL₁幼虫が分離され, 両溶液ともに優れた分離効率を示すことが認められた。

不連続密度勾配遠心法の短所としては, 勾配液の作成に長時間を要し, また, 密度勾配液上に重層する糞再浮遊液中の固形成分が多い場合に, それらが沈殿して密度勾配を破壊し, 結果的に分離を困難にすることがしばしば認められた (田口ら, 1988)。したがって多量の糞を処

理して多数のL₁幼虫を集めるには何らかの改良を加える必要性があった。

c) 遠心浮上法は以前から硫酸亜鉛溶液(比重1.18)を用いて消化管寄生原虫の嚢子および蠕虫卵の検査に用いられている(Burrows, 1965; Soulsby, 1969; Faust *et al.*, 1976)。また Sulston and Brenner (1974) は *Caenorhabditis elegans* の幼虫を35%蔗糖液を用いて、Moncol and Triantaphyllou (1978) は *Strongyloides ransomi* の虫卵を密度1.13 g/mlの蔗糖液を用いて、それぞれ遠心浮上法で分離している。しかしこれらの報告では、蔗糖液の上部に蒸留水を重層する手技は行われていない。

本研究では、まず遠心浮上法に用いる蔗糖液の濃度差がL₁幼虫の分離効率に及ぼす影響を検討したところ、蔗糖液の濃度が高くなるほど分離効率も高くなり、40%蔗糖液を用いた場合に最も高い回収率となった。このことは虫体の比重(1.05~1.07)と用いた蔗糖液の密度の差が大きいのほど浮上力が大きくなるので、分離効率が良いことを示している。

次に糞遠心沈渣の再浮遊に用いる40%蔗糖液量の影響について検討した結果、糞沈渣と等量あるいは2~8倍量の40%蔗糖液を用いても分離効率には大差がなかった。また遠心操作は高い回収率を得るために不可欠であることが判明したが、1,000rpm, 3分間の遠心と2,000rpm, 5分間の遠心では回収率に殆ど差がなかった。さらに糞沈渣を40%蔗糖液で再浮遊させ、少量(1 ml)の蒸留水を重層して遠心したところ、蒸留水を重層しなかった場合と比較して、回収率が高く、糞固形成分(夾雑物)の混入量も少ないことが示された。この回収率の向上の機構は不明であるが、遠心浮上法は遠心力場において、溶媒と粒子の密度の差が正の粒子は沈降し、負の粒子は浮上することを利用したものである(高浪, 1962)。そこで、40%蔗糖液に蒸留水を重層して遠心すると、密度差により浮上してきた虫体が、蒸留水の重層により形成された密度勾配相(蔗糖濃度の薄い相)に入り、粘度の低下などにより、より浮上し易くなったことによると考えられる。逆に言えば、蒸留水を重層しなかった場合の低い回収率は、蔗糖液の粘性により、浮上力が影響されたものと考えられる。

ネズミ糞線虫のL₃幼虫をラットに感染させると、5日目頃から糞便内にL₁幼虫の排出がみられるが、約2週間後にはラット糞中のLPG(larva per gram)が著しく低下する傾向を示すので(天野ら, 1959)、感染後期のラット糞から培養実験に用いるL₁幼虫を分離するためには比較的多量の糞を処理しなければならない。我々が改良した蒸留水重層蔗糖液遠心浮上法は、回収率が高く、操作が簡便で、多量の糞からの分離も確実に出来る

ことが示され、優れた分離法であると考えられた。

文 献

- 1) 阿部康男・田中寛(1965): *Strongyloides ratti* Sandgroumd, 1925の染色体に関する研究. 寄生虫誌, 14, 520-525.
- 2) 天野良治(1959): *Strongyloides ratti*を用いた糞線虫駆除剤検定の研究, 第2編 *Strongyloides ratti*のラット感染に於ける排卵数の経過. お茶の水医誌, 7, 1484-1492.
- 3) 天野良治・水野英彦・丹下仁・田中寛(1959): ラットに感染させた *Strongyloides ratti* 寄生成虫数の経過. お茶の水医誌, 7, 2928-2931.
- 4) Arizono, N. (1976): Studies on the free-living generation of *Strongyloides planiceps* Rogers, 1943. 1. Effect of quantity of food and population density on the developmental types. J. Parasitol., 25, 274-282.
- 5) Burrows, R. B. (1965): Microscopic diagnosis of the parasites of man. Yale University Press, New Haven and London, 34-38.
- 6) Eugui, E. M. and Allison, A. C. (1979): Separation of erythrocytes infected with murine malaria parasites in metrizamide gradients. Parasitology, 79, 267-275.
- 7) Faust, E. C., Beaver, P. C. and Jung, R. C. (1976): Animal agents and vectors of human disease. 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 425-428.
- 8) 藤岡寿・川本文彦・熊田信夫(1983): ネズミマリア原虫に関する研究. I. 不連続密度勾配液による原虫感染赤血球とメロゾイトの分離精製法. 寄生虫誌, 32, 99-108.
- 9) Fujita, K., Tajima, K., Tominaga, S., Tsukidate, S., Nakada, S., Imai, Y. and Hinuma, Y. (1985): Seroepidemiological studies of *Strongyloides* infection in adult T-cell leukemia virus carriers in Okinawa Island, Japan. Tropical Medicine, 12, 203-209.
- 10) Galliard, H. (1967): Pathogenesis of *Strongyloides*. Helminth. Abstr., 36, 247-260.
- 11) Graham, G. L. (1939): Studies on *Strongyloides*. V. Constitutional differences between a homogonic and a heterogonic line of *S. ratti*. J. Parasitol. 25, 365-375.
- 12) Hansen, E. L., Buecher, E. J., and Cryan, W. S. (1969): *Strongyloides fulleborni*: Environmental factors and free-living generation. Exp. Parasitol. 26, 336-343.
- 13) 堀栄太郎・高木実(1972): 尋常性天疱瘡に合併した糞線虫症の一部検例. 寄生虫誌, 21, 241-246.
- 14) 加藤義昭・一柳貢・佐野峰雄・石原晃・熊田信夫・大宅さほ子(1970): 糞線虫症による蛋白喪失性腸症の1例. 胃と腸, 5, 701-706.
- 15) 川平稔(1983): 糞線虫症. 病理と臨床 1, 1448-

- 1453.
- 16) 宮本健司 (1986) : 北海道の犬・猫・キタキツネに寄生する糞線虫, およびその虫卵とフィラリア型幼虫の抵抗性. 寄生虫誌, 35, 512-520.
- 17) Moncol, D. J. and Triantaphyllou, A. C. (1978) : *Strongyloides ransomi* : Factors influencing the in vitro development of the free-living generation. J. Parasitol., 64, 220-225.
- 18) Murrell, K. D. (1981) : Protective role of immunoglobulin G in immunity to *Strongyloides ratti*. J. Parasitol., 67, 167-173.
- 19) Nakada, k., Kohakura, M., Komoda, H. and Hinuma, Y. (1984) : High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis*. Lancet, March. 17, 633.
- 20) Neva, F. A. (1986) : Biology and immunology of human strongyloidiasis. J. Inf. Dis., 153, 397-406.
- 21) Nwaorgu, O. C. (1983) : The development of the free-living stages of *Strongyloides papillosus* 1. Effect of temperature on the development of the heterogonic and homogonic nematodes in fecal culture. Vet. Parasitol., 13, 213-223.
- 22) Ohashi, K., Abe, T., Korenaga, M. and Nawa, Y. (1986) : Eosinophil chemotactic factor-release from guinea pig neutrophils after in vitro stimulation with *Strongyloides ratti* larvae. Jpn. J. Parasitol., 35, 121-126.
- 23) Premvati (1958a) : Studies on *Strongyloides* of primates II. Factors determining the, "direct" and the "indirect" mode of life. Can. J. Zool., 36, 185-195.
- 24) Premvati (1958b) : Studies on *Strongyloides* of primates III. Observations on the free-living generations of *S. fulleborni*. Can. J. Zool., 36, 447-452.
- 25) Rickwood, D. and Birnie, G. D. (1975) : Metrizamide, a new density gradient medium. FEBS. Let., 50, 102-110.
- 26) Rowley, P. T., Siddiqui, W. A. and Geiman, Q. M. (1967) : Separation of malarial parasites according to age by density gradient centrifugation. J. Lab. Clin. Med., 70, 933-937.
- 27) Shiwaku, K., Chigusa, Y., Kadosaka, T. and Kaneko, K. (1988) : Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. Parasitol., 97, 129-138.
- 28) 塩坂孝彦・小山孝・斎藤修二・塩飽邦憲・河野秀久・藤田繁・松本勲・小林譲・友岡康雄・中村資郎・木村茂・吉田浩巳・西田弘 (1979) : 愛媛県下で家族的に発生した糞線虫症. 臨床と研究, 56, 3299-3305.
- 29) Soulsby, E. J. L. (1969) : Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere-Tindall and Cassell, London, 787-792.
- 30) Sulston, J. E. and Brenner, S. (1974) : The DNA of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 77, 95-104.
- 31) Tada, I., Mimori, T. and Nakai, M. (1979) : Migration route of *Strongyloides ratti* in albino rats. Jpn. J. Parasitol., 28, 219-227.
- 32) 田口五弘・須藤千春・熊田信夫 (1988) : ネズミ糞線虫第1期幼虫の分離法について. 寄生虫誌, 37, (1, 補), 57
- 33) 高浪満 (1962) : 細胞分画法, 生物物理化学実験法. 培風館. 東京. 356-3730
- 34) 田辺是憲 (1938) : *Strongyloides ratti* 仔虫の发育概略並びに固有宿主における发育状況. 慶応医学, 18, 785-794.
- 35) 田中寛 (1955) : 糞線虫, 日本における寄生虫学の研究 2. 目黒寄生虫館. 東京. 241-277.
- 36) Tanaka, H. and Amano, R. (1960) : Studies on *Strongyloides ratti* with a special reference to the screening test for *Strongyloides* anthelmintics. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 7, 193-230.
- 37) Triantaphyllou, A. C. and Moncol, D. J. (1977) : Cytology, reproduction, and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *Strongyloides papillosus*. J. Parasitol., 63, 961-973.
- 38) Varju, L. (1966) : Studies on *Strongyloides* VI. The nature of changes in the developmental course of swine *Strongyloides*. Z. Parasitenk., 28, 175-192.
- 39) Yamaguchi, K., Matutes, E., Catovsky, D., Galton, D. A. G., Nakada, K. and Takatsuki, K. (1987) : *Strongyloides stercoralis* as candidate co-factor for HTLV-I-induced leukaemogenesis. Lancet, July, 11, 94-95.

Abstract

STUDIES ON THE DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION OF
STRONGYLOIDES RATTI
I. IMPROVED ISOLATION METHOD OF THE FIRST-STAGE LARVAE

ITSUHIRO TAGUCHI, CHIHARU SUTO AND NOBUO KUMADA

(Department of Medical Zoology, Nagoya University School of Medicine,
Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466, Japan)

In order to improve the collection method of the first-stage larvae (L_1) of *Strongyloides ratti* from the feces of infected rat, discontinuous density gradient centrifugation methods with Isopaque® or sucrose solutions were tested in the first place. Although ca. 70% and 84% of L_1 in the rat feces, respectively, were fractionated at densities of 1.05 g/ml (Isopaque®) and 1.07 g/ml (sucrose), these conventional methods were inadequate for the purpose in taking much time for the preparation of the gradient solutions and in the fragility of the gradients to the food wastes remained in the fecal suspension. In the next place, a modified flotation centrifugation method was invented, in which a small volume of distilled water was overlaid on the floating fluid, 40% sucrose solution, before centrifugation. The modified procedures were carried on with the preparation of ca. 10% suspension of the freshly collected rat feces in distilled water, filtration of the fecal suspension through a layer of cotton gauze, centrifugation of the filtrate at 1,500 rpm for 3 min to get crude fecal sediment; then the sediment was resuspended with 40% sucrose solution in a test tube before adding ca. 1 ml distilled water on the top of the resuspension. The test tube was then centrifuged again at 1,500 rpm for 3 min, and finally, more than 93% of the viable L_1 in the fecal suspension were isolated from the boundary layer between the sucrose solution and distilled water with a Pasteur pipette. This method is more simple and efficient than any other methods ever described for the isolation of L_1 of *Strongyloides* spp. from the feces.